节肢动物 ABC 转运蛋白及其介导的杀虫剂抗性

戚伟平[1,2], 马小丽[1,2], 何玮毅[1,2], 陈 玮[1,2], 董人富[1,2], 尤民生[1,2,*]

(1. 福建农林大学应用生态研究所, 福州 350002; 2. 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室, 福州 350002)

摘要: 腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter),简称 ABC 转运蛋白(ABC transporter),是继细胞色素 P450 单加氧酶、羧酸酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶之后又一类参于解毒作用的重要蛋白家族,因其在杀虫剂解毒等方面起着非常重要的作用,近年来逐渐受到广泛关注。ABC 转运蛋白是一大类跨膜蛋白,其核心结构通常由 4 个结构域组成,包括 2 个高度疏水的跨膜结构域(transmembrane domains , TMD)和 2 个核苷酸结合域(nucleotide binding domains, NBD)。根据序列相似性和保守结构域,可以把 ABC 转运蛋白家族分为 8 个亚家族,每个亚家族的成员数及功能不同。这类蛋白在各种生物体内均有分布,其主要功能包括转运物质、信号传导、细胞表面受体及参与细胞内 DNA 修复,转录及调节基因的表达过程等。此外,近年来的研究表明,ABC 转运蛋白的突变或过表达不仅与节肢动物对化学农药的抗药性密切相关,而且在抗 Bt 毒素方面也起着非常重要的作用,对转 Bt 作物造成严重威胁。本文综述了节肢动物 ABC 转运蛋白的结构,ATP 水解介导的作用机制,亚家族的分类、结构及生理功能,以及由 ABC 转运蛋白介导的抗药性研究进展,旨在深入了解 ABC 转运蛋白的研究现状及其在节肢动物抗药性方面的作用,为阐明节肢动物抗药性机制提供新的理论依据,对改进农业害虫的抗性监测和治理策略也具有一定的指导意义。

关键词: 节肢动物; ABC 转运蛋白; 分子结构; 亚家族; 生理功能; 介导抗性

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2014)06-0729-08

ATP-binding cassette transporters and their mediated resistance to insecticides in arthropods

QI Wei-Ping[1,2], MA Xiao-Li[1,2], HE Wei-Yi[1,2], CHEN Wei[1,2], DONG Ren-Fu[1,2], YOU Min-Sheng[1,2,*]
(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China)

Abstract: ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) are a recently documented family of detoxification-involved proteins following cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs) and carboxylesterases (COEs). Over the last few years, these enzymes have been getting broad recognition and receiving extensive attention because of their important functions in the detoxification of insecticides. The ABC transporter is one of the major transmembrane protein families, which comprises four core domains with two highly conserved domains or nucleotide binding domains (NBDs) and two highly hydrophobic transmembrane domains (TMDs). In arthropods, the ABC transporter gene family can be divided into eight subfamilies (ABCA - ABCH), which vary in the number of members and their functions, based on the similarity of amino acid sequences and the conserved domains. These proteins are distributed in all living organisms on earth, and exhibit many vital roles including substrate transporters, signal transduction, cell-surface receptor, and special roles in DNA repair, translation and regulation of gene expression. In addition, recent advances in this area have shown that the mutation and/or overexpression of ABC transporters in arthropods are associated with the resistance of both pesticides and Bt toxins. In fact, they may potentially threaten the sustainability of Bt crops. This article presents an overview on the molecular structure and ATP-driven functions of the ABC transporters, and also the classification, molecular structure and physiological functions of the ABC-transporter subfamilies. We also described the research progress made on insecticide resistance mechanisms mediated by the ABC

基金项目: 国家自然科学基金项目(31230061, 31320103922)
作者简介: 戚伟平, 女, 1990 年生, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向农业害虫综合治理, E-mail: 1091864406@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn
收稿日期 Received: 2014-01-10; 接受日期 Accepted: 2014-05-21

transporters in hoping to provide some basis for improving monitoring and management strategies of the insecticides used for pest control in agroecosystems.

Key words: Arthropod; ABC transporter; molecular structure; subfamily; physiological function; mediated resistance

腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter),简称 ABC 转运蛋白(ABC transporter),是一大类跨膜蛋白,在古生菌、真细菌及真核生物 3 大界中均保守存在并具有重要的生理功能(Ames *et al*., 1990; Higgins, 1992)。ABC 转运蛋白最先是在原核生物细菌中发现的,真核生物中的第一个 ABC 转运蛋白(P-糖蛋白,ABCB1)是在人类 *Homo sapiens* 中发现的(Dean *et al*., 2001)。大部分的 ABC 转运蛋白被认为是主动运输的转运蛋白。近年来发现,ABC 转运蛋白广泛存在于多种正常的组织和器官,参与药物和内、外源毒素的吸收、分布及排泄,具有解毒和防御保护的功能。据报道,ABC 转运蛋白部分成员的过表达与人体肿瘤细胞的多药物抗性(multidrug resistance, MDR)密切相关,是导致化疗失败的主要原因(Dean *et al*., 2001)。

根据功能的不同,可以将 ABC 转运蛋白分成 3 大类,分别是输入蛋白、输出蛋白和非转运蛋白(Saurin *et al*., 1999)。输入和输出蛋白的主要功能是运输一系列的底物;非转运蛋白则不具备转运功能,而是参与细胞内 DNA 修复,转录及调节基因的表达过程(Saurin *et al*., 1999; Dassa and Bouige, 2001; Bouige *et al*., 2002)。虽然在哺乳动物中 ABC 转运蛋白在药物抗性方面的贡献已经被广泛研究,可是它们在节肢动物抗药性方面的作用尚不明确。随着越来越多的节肢动物全基因组测序的完成,有关 ABC 转运蛋白基因家族的研究报道也日益增多。已有研究表明,ABC 转运蛋白在昆虫的生长发育过程中起作用,参与一些重要的生理过程如尿酸代谢,并在抗药性方面起作用(Labbé *et al*., 2011b)。为了研究 ABC 转运蛋白在节肢动物抗性中所起的重要性,本文对目前已研究的 8 种节肢动物的 ABC 转运蛋白的分类、结构、生理功能及其与抗药性的关系进行了综述。

1 ABC 转运蛋白的分子结构和作用机制

ABC 转运蛋白是一种膜整合蛋白,它可利用细胞内的能量促使物质逆浓度梯度跨细胞膜转运(Jones and George, 2004)。目前已经研究报道的 ABC 转运蛋白在各个物种间相对比较保守,核心结构基本都是由 4 个结构域组成,包括 2 个高度疏水的跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和 2 个核苷酸结合域(nucleotide binding domain, NBD; 图 1)(Dean *et al*., 2001; Linton, 2007),这 4 个结构域可以有不同的结合形式(Higgins and Linton, 2003)。由 2 个 NBDs 和 2 个 TMDs 组成的 ABC 转运蛋白为全转运蛋白,而那些只有 1 个 NBD 和 1 个 TMD 的转运蛋白则被称为半转运蛋白(Hollenstein *et al*., 2007),半转运蛋白常通过形成同源二聚体或异源二聚体来行使作用。每个 TMD 一般由 6 个 α 螺旋构成,但也存在一个 TMD 由 10 个或 17 个或 19 个 α 螺旋组成的现象,它们形成了一个跨膜通道以实现底物分子的跨膜运输,同时还参与底物的识别过程。NBD 位于胞质面的一侧,可结合和水解 ATP(Seeger and van Veen, 2009),每个 NBD 有一系列高度保守的基序 walker A 基序(P-loop)、walker B 基序、ABC signature、A-loop、D-loop、H-loop 以及 Q-loop(图 1)(Linton, 2007)。A-loop 包含一个芳香族氨基酸残基通常是酪氨酸,walker A 基序(P-loop)和 walker B 基序表明核苷酸结合位点的存在(Walker *et al*., 1982),ABC signature 是 ABC 转运蛋白的特征(Dean *et al*., 2001),它们在催化循环中 ATP 的结合、水解以及 ADP 的释放方面起着无可替代的作用(Seeger and van Veen, 2009)。由于 NBD 都具有水解 ATP 的作用,所以它们的同源性较高,而 TMD 则具有多样性,是因为 ABC 转运蛋白需要结合并运输不同底物(Seeger and van Veen, 2009)。

Jones 和 George(2004)对 ABC 转运蛋白的结构和作用机制进行了概述,分析了 ABC 结构及其相关蛋白的数据,并讨论这些数据与转运蛋白分子机制的关系。ABC 转运蛋白活性的标志是 ATP 水解介导的开关转运机制(Higgins and Linton, 2004),这个独特的反应循环是底物向胞外转运的重要分子基础(图 1)(Linton, 2007)。Seeger 和 van Veen(2009)通过综述 ABC 转运蛋白抗药性的分子机制,认为 TMD 决定物质转运的方向,当药物结合到 TMD 后,促使 ATP 与 NBD 结合,改变 ABC 的构象并水解成 ADP 提供能量,将药物转出细胞,随后 ABC 构象恢

复，ADP 释放。此外，他们还概述了目前 ABC 转运蛋白的不同转运模式，建立了结构和功能的关系。Gyimesi 等(2011)的研究也表明，ATP 的水解可改变 ABC 的构象并启动物质的转运。

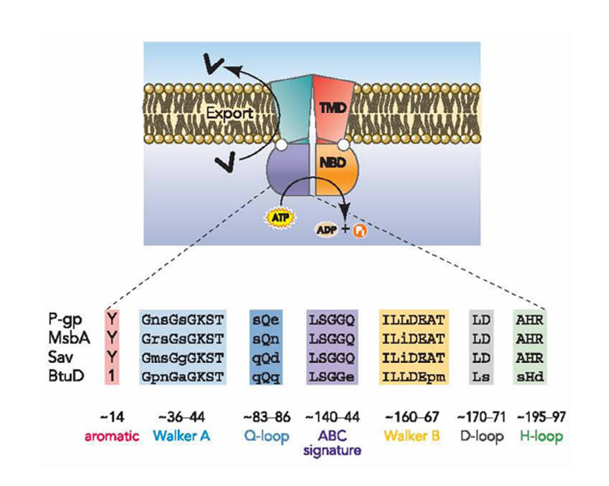


图 1　ABC 转运蛋白的分子结构和作用机制图示(引自 Linton, 2007)

Fig. 1　Illustration for molecular structure and action mechanism of the ABC transporters (adopted from Linton, 2007)

ATP 的水解由多种药物刺激，这一观点通常作为鉴定 ABC 多药物转运蛋白的指标。1992 年，Ambudkar 等(1992)在研究人体中参与癌细胞化疗药物运出的 ABC 转运蛋白(ABCB1)时，证明了药物促进 ATP 水解的作用，人的 ABCB1 是首个被确定的由药物绑定刺激 ATP 水解的 ABC 转运蛋白；1997 年，Shapiro 和 Ling(1997)利用细胞核染色的运输测定实验，证明了药物进入 ABC 转运蛋白胞质面的一个高亲和性的位点，诱导 ATP 的结合和水解，进而导致药物结合位点的亲和性降低，引起药物释放到细胞膜的外侧或水相环境中。

2　ABC 转运蛋白的亚家族分类

根据 ATP 结合位点的序列相似性，人类的 ABC 转运蛋白被分为 7 个亚家族 (A ~ G)，这些亚家族在所有真核基因组中都存在，说明它们的起源较早(Dean and Annilo, 2005)。ABCH 亚家族则是在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 基因组测序分析之后首次发现的(Dean *et al*., 2001)，随后获得的节肢动物家蚕 *Bombyx mori*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 等基因组的 ABC 家族也都包含 ABCH 亚家族，且在二斑叶螨 *T. urticae* 中数目远大于其他物种(表 1)，但是在植物、蠕虫、酵母及哺乳动物基因组中不存在(Dean and Annilo, 2005)。

随着近几年大规模的全基因组测序、ESTs 测序以及基因组精细图绘制等一系列工作的完成，ABC 基因家族得到了广泛的研究。除了人类以外，一些节肢动物(包括甲壳纲、蛛形纲、昆虫纲的双翅目、鳞翅目和鞘翅目)的 ABC 转运蛋白均有报道(Dean *et al*., 2001; Roth *et al*., 2003; Sturm *et al*., 2009; Labbé *et al*., 2011b; Liu *et al*., 2011; Xie *et al*., 2012; Broehan *et al*., 2013; Dermauw *et al*., 2013; You *et al*., 2013)。已有的研究表明，人类 *H. sapiens* 基因组中有 48 个 ABC 基因、水蚤 *Daphnia pulex* 有 64 个、二斑叶螨 *T. urticae* 有 103 个、黑腹果蝇 *D. melanogaster* 有 56 个、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 有 52 个、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 有 41 个、家蚕 *B. mori* 有 51 个、赤拟谷盗 *T. castaneum* 有 73 个、小菜蛾 *Plutella xylostella* 有 100 个，由此可见不同物种的 ABC 基因数量存在明显差异；此外，各个亚家族的数目也存在差异，尤其是 ABCC，ABCG 和 ABCH 3 个亚家族的数目差异更为明显(表 1)。从表 1 我们可以看出，除小菜蛾外，其他所有物种都只有一个 ABCE 基因，小菜蛾 *P. xylostella* 中 ABCE 亚家族有 12 个成员，明显高于其他物种，这可能是由于基因的扩张所造成的。不同物种所拥有的 ABCD 和 ABCF 这两个亚家族的基因数量也比较接近，这可能说明 ABCE，ABCD 和 ABCF 在物种进化中是比较保守的。通过对抗药性排名第一的农业害虫二斑叶螨 *T. urticae* 进行研究，发现 ABCC，ABCG 和 ABCH 3 个亚家族存在串联重复造成的扩张现象(Van Leeuwen *et al*., 2010)。进一步的比对表明，昆虫纲果蝇 *D. melanogaster*、甲壳纲水蚤 *D. pulex*、线虫门秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 及哺乳动物人类 *H. sapiens* 这 4 个物种也存在类似的现象，这 3 个亚家族的扩张现象可能与抗药性和食性相关(Dermauw *et al*., 2013)。这个结论在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中也已证实(Broehan *et al*., 2013)。

3　ABC 转运蛋白各亚家族的结构及主要生理功能

ABCA 亚家族在哺乳动物中的主要特征是全转运蛋白，在胞内脂质转运过程中起着非常重要的作用(Wenzel *et al*., 2006)，但它们在节肢动物中的功能尚不明确，根据其较高的结构保守性推测，可能也

表 1 不同物种 ABC 转运蛋白基因的亚家族及其数量

Table 1 Subfamilies and their numbers of the ABC-transporter genes in different species

物种 Species	A	B	C	D	E	F	G	H	总数 Total	参考文献 References
人类 *Homo sapiens*	13	11	12	4	1	3	5	0	48	Dean *et al*., 2001
黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	10	8	14	2	1	3	15	3	56	Dean *et al*., 2001
赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	10	6	35	2	1	3	13	3	73	Broehan *et al*., 2013
西方蜜蜂 *Apis mellifera*	3	5	9	2	1	3	15	3	41	Liu *et al*., 2011
冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*	9	5	13	2	1	3	16	3	52	Roth *et al*., 2003
水蚤 *Daphnia pulex*	4	7	7	3	1	4	23	15	64	Sturm *et al*., 2009
家蚕 *Bombyx mori*	6	8	15	2	1	3	13	3	51	Liu *et al*., 2011
二斑叶螨 *Tetranychus urticae*	9	4	39	2	1	3	23	22	103	Dermauw *et al*., 2013
小菜蛾 *Plutella xylostella*	9	18	18	7	12	3	19	14	100	You *et al*., 2013

是在脂质转运过程中起重要作用。到目前为止，仅在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中通过 RNA 干扰（RNAi）技术沉默 *TcABCA-9A* 和 *TcABCA-9B*，发现蛹在羽化过程中出现翅膀残缺或者缩短的现象进而导致 30% 的死亡率，证实了 ABCA 与赤拟谷盗 *T. castaneum* 的翅膀发育相关（Broehan *et al*., 2013）。ABCB 亚家族包括全转运蛋白和半转运蛋白。ABCB1 是人类中发现的第一个在癌症中抗药物的蛋白，后来的研究表明在 ABCB 亚家族中有更多的药物抗性蛋白（Gottesman *et al*., 2002）。根据序列的相似性，昆虫的 ABCB 亚家族被认为也参与了杀虫剂及其他化学药物的抗性（Labbé *et al*., 2011b）。关于 ABCC 亚家族，在人类中都是全转运蛋白，而在昆虫中既有全转运蛋白也有半转运蛋白（Dean *et al*., 2001; Liu *et al*., 2011; Broehan *et al*., 2013）。哺乳动物的 ABCC 亚家族成员包含一些与多抗药性相关的蛋白，参与离子转运、毒素排泄、信号传导以及一些其他功能（Dean *et al*., 2001）。ABCC 还可以作为细胞表面受体起作用，其中最重要的是 ABCC 亚家族中的磺酰脲类受体 SUR，它可以作为苯甲酰基苯脲 BPUs 的受体，抑制昆虫和螨类几丁质合成，从而抑制其生长（Post and Vincent, 1973）。许多 ABCC 转运蛋白能够特异性的转运多种药物，被称为多药物抗性相关蛋白（multidrug resistance-associated protein, MRP），并且与短的 MRPs（MRP4, 5, 8 和 9）相比，长的 MRPs（MRP1 -3,6 和 7）在 N 末端有一个额外的跨膜结构（Deeley *et al*., 2006）。已有研究表明节肢动物的 ABCC 转运蛋白和药物抗性相关（Labbé *et al*., 2011b），在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 中发现 ABCC2 的突变增强了 Bt 抗性（Gahan *et al*., 2010）。在节肢动物赤拟谷盗 *T. castaneum* 和二斑叶螨 *T. urticae* 中，ABCC 亚家族由于基因的串联重复导致数量繁多，且在二斑叶螨 *T. urticae* 中已证实这种扩张基因扩张现象与其抗性相关（Broehan *et al*., 2013; Dermauw *et al*., 2013）。ABCD 亚家族的成员都是半转运蛋白，ABCD 转运蛋白定位在亚细胞过氧化物酶体上并参与脂肪酸或脂肪酰运入到过氧化物酶体的过程（Theodoulou *et al*., 2006）。ABCE 和 ABCF 缺少 TMD，而且每一个成员都包含一对相连的 NBD（Kerr, 2004）。大多数真核生物只有一个 ABCE 基因，与其他的 ABC 转运蛋白不同，它们没有转运物质的功能，而且 ABCE 和 ABCF 亚家族在所有生物的进化中高度保守。已报道的 ABCG 转运蛋白都是半转运蛋白，重要的是每一个 ABCG 转运蛋白在 NBD 的 C 末端区域有一个 TMD，显示出一个与其他亚家族不同的结构（Holland *et al*., 2003）。黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的 ABCG 亚家族中的一个成员在其眼睛形成过程中参与色素前体的吸收（Mackenzie *et al*., 1999）。ABCH 在不同物种中的数量都比较保守，家蚕 *B. mori* 的系统进化分析表明 ABCH 家族的基因来自一个共同的祖先且在组织结构形式上与 ABCG 最相近，

但是目前尚不明确它们的功能(Liu *et al*., 2011)。

在家蚕 *B. mori* 中,多个 ABC 基因表现出发育阶段和组织特异性偏好表达。其中有 1 个 ABCG 基因(*BmABC*002712)仅在马氏管中高表达,暗示其具有组织特异性功能。同时,至少有 5 个 ABCG 基因(*BmABC*005226, *BmABC*005203, *BmABC*005202, *BmABC*010555 和 *BmABC*010557)在中肠中偏好表达,并且和 20-羟基蜕皮激素(20E)的受体基因表达模式相似。用 20E 处理诱导 ABCG 基因,检测其在中肠的表达,并用 RNAi 技术干扰沉默 20E 的受体基因 USP,降低了 ABCG 基因的表达,表明这些中肠偏好表达的 ABCG 基因受 20E 的诱导(Liu *et al*., 2011)。通过 RNA 干扰沉默赤拟谷盗 *T. castaneum* 中 ABC 基因的表达,会抑制其生长,导致局部黑化、眼睛色素缺陷、不正常的角质层的形成、产卵及卵孵化的缺陷,甚至无法羽化和严重脱水,死亡率显著增加,这可能与 ABC 转运蛋白在转运脂质、蜕化类固醇以及眼睛色素方面的作用有关(Broehan *et al*., 2013),表明其在昆虫体内功能重要且多元化。

4　ABC 转运蛋白介导节肢动物的抗药性

经典的昆虫抗药性研究主要集中在细胞色素单加氧酶(P450)、羧酸酯酶(COE)以及谷胱甘肽 S-转移酶(GST)3 个家族(Li *et al*., 2007),近年来,对 ABC 转运蛋白解毒作用的研究逐渐受到广泛关注。在众多的生理功能中,节肢动物中与人类 P-gps 和 MRPs 直系同源的 ABC 转运蛋白常和抗药性相关(Lanning *et al*., 1996; Buss and Callaghan, 2008; Baxter *et al*., 2011; Heckel, 2012),并越来越受到重视。和家蚕 *B. mori* 相比,小菜蛾 *P. xylostella* 基因组中 ABC 转运蛋白基因家族的扩张明显高于其他 3 个家族(P450, GST, COE),在抗药性品系的小菜蛾 *P. xylostella* 中,ABC 转运蛋白基因比其他 3 个家族的成员上调表达更为频繁。与敏感品系相比,A, C, G, H 和 F 亚家族的成员在小菜蛾 *P. xylostella* 抗毒死蜱品系中相对高表达,在抗氟虫腈品系中 A, C, G 及 H 亚家族的成员相对高表达(He *et al*., 2012; You *et al*., 2013)。ABC 转运蛋白主要参与解毒机制的第 3 个阶段,清除第 1 和第 2 阶段的反应产物(Chahine and O'Donnell, 2011)。P450 是第 1 反应阶段的主要酶(Feyereisen, 1999),谷胱甘肽是第 2 反应阶段的标志酶(Ranson and Hemingway, 2005)。由于 P450 的反应产物有时甚至比母体化合物毒性更大,如农药硫代磷酸的初级代谢产物(Feyereisen, 1999),在这种情况下,第 3 阶段的清除反应就尤为重要。

昆虫中抗药性的产生主要与靶标位点抗药性的敏感度降低和代谢解毒基因表达水平或性质的改变有关(Li *et al*., 2007; Van Leeuwen *et al*., 2010),ABC 转运蛋白通过抑制细胞内药物及其代谢产物的积累对抗性起作用(Buss and Callaghan, 2008)。相比之下,通过利用 ABC 转运蛋白调节对外源有害物质的耐受性是一种更为合理利用能量的方式,例如烟草天蛾 *Manduca sexta* 马氏管中的 P-糖蛋白类似物多药转运蛋白能够将烟草中的神经毒素尼古丁有效地分泌出去,使其能够顺利取食烟草叶片而免受毒害(Murray *et al*., 1994)。从一系列昆虫的 ABC 转运蛋白与抗药性的研究中发现它们与昆虫解毒机制的关系非常密切。

众所周知,在节肢动物和人体细胞中 ABC 转运蛋白成员如 MRP 基因的高表达是对多种药物产生抗性的主要原因(Karnaky *et al*., 2003; Chen *et al*., 2008; Lombardo *et al*., 2008)。在鳞翅目昆虫粉蚊夜蛾 *Trichoplusia ni* 中,ABC 转运蛋白基因 *TrnMRP*1 和 *TrnMRP*4 在马氏管中高表达,它很可能起着将代谢废物或吸收的外源有害物质分泌出去的功能(Labbé *et al*., 2011a)。在双翅目黑腹果蝇 *D. melanogaster* 中,暴露在高剂量的 MRP 的底物甲氨蝶呤毒素下,能够诱导 MRP1 直系同源物 dMRP 的高表达(Chahine and O'Donnell, 2009)。在鳞翅目昆虫粉蚊夜蛾 *T. ni* 和家蚕 *B. mori* 中,ABC 转运蛋白的 ABCB, ABCG 及 ABCH 亚家族的一些成员有抗异源物质的作用,这些成员的高表达有助于提高其对杀虫剂的抗性(Labbé *et al*., 2011b)。二斑叶螨 *T. urticae* 中有 103 个 ABC 转运蛋白基因,是目前为止报道的节肢动物中鉴定出 ABC 数量最多的物种,发现 ABCC, ABCG 和 ABCH 3 个亚家族存在串联重复造成的扩张现象(Van Leeuwen *et al*., 2010)。并且在抗螨虫剂品系中这些家族表达上调,暗示它们在解毒方面的重要作用。但是要获得抗性方面的证据还需要我们做进一步的研究(Dermauw *et al*., 2013)。

ABC 转运蛋白除了可以作为一种运输蛋白将杀虫剂或者代谢产物运出细胞外,还可以起到细胞表面受体的作用(Post and Vincent, 1973)。利用苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)毒素毒杀鳞翅目昆虫,需要先被摄取,然后通过中肠蛋白酶激活毒性,最后与中肠受体结合(Soberon *et al*., 2009)。

因此,昆虫中肠上的受体结合位点是决定毒素有无活性的关键,在靶标害虫中这种结合的弱化或丧失是一种重要的抗性机制(Ferré and Van Rie, 2002; Pigott and Ellar, 2007)。在烟芽夜蛾 *H. virescens* 中,研究发现一个 ABC 转运蛋白 ABCC2 的失活突变和抗 Bt cry1Ac 毒素有关,并且和 Cry1Ac 结合到刷状缘膜囊 BBMV 上有关(Gahan *et al*., 2010)。

在实验室筛选出来的烟芽夜蛾 *H. virescens* (Gahan *et al*., 2001)、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*(Morin *et al*., 2003)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Xu *et al*., 2005)品系中,它们的 12-钙粘蛋白突变能引起其对 Cry1Ac 的抗性。然而改良的 Bt 毒素能够杀死携有钙粘蛋白突变的棉红铃虫,表明还存在另外一个重要的 Bt 结合位点(Soberón *et al*., 2007)。最近,通过基因定位在烟芽夜蛾 *H. virescens* 中找到第 2 个独立的抗 Cry1Ac 的抗性机制,是一个 ABCC2 的非活性突变体(Gahan *et al*., 2010),这是首次关于 ABCC2 的突变体和 Bt 抗性相关的报道。在烟芽夜蛾 *H. virescens* 抗性品系 YHD2 中,已有研究表明 12-钙粘蛋白主要结构域的突变导致对 Cry1Ac 毒素 6 000 倍的抗性(Gahan *et al*., 2001),然而,它的突变并没有降低或减少 Cry1Ac 毒素与中肠膜的结合(Lee *et al*., 1995)。在烟芽夜蛾 *H. virescens*、小菜蛾 *P. xylostella*(NO-QAGE)、粉蚊夜蛾 *T. ni* 和家蚕 *B. mori* 中,ABCC2 基因的突变能够对 Cry1Ac 产生抗性(Gahan *et al*., 2010; Baxter *et al*., 2011; Atsumi *et al*., 2012),而且一个同时携带有钙粘蛋白和 ABCC2 基因突变的烟芽夜蛾 *H. virescens* 抗性品系 YHD2,具有对 Cry1Fa 的交互抗性并且丧失了与 Cry1Fa 结合的能力(Jurat-Fuentes *et al*., 2002)。

Atsumi 等(2012)通过转基因的方法将 Bt 敏感的等位基因引入到家蚕 *B. mori* 抗 Bt 品系中,证明了是由 ABC 转运蛋白的一个直系同源物的突变造成了 Bt 抗性,转运蛋白基因的抗性归功于一个酪氨酸插入到预测的跨膜蛋白 TMD 的外环上。通过在 sf9 细胞中过量表达家蚕 *B. mori* 的 ABCC2,发现家蚕 *B. mori* 的 ABCC2 是毒素 Cry1A 的受体(Tanaka *et al*., 2013),这种影响使我们对 ABC 转运蛋白的作用有了新的看法,为我们在 Bt 抗性的研究提供了新的方向。

5 小结与展望

到目前为止,全世界已经完成基因组测序的节肢动物有 60 多种,但是对 ABC 转运蛋白基因家族进行比较详细研究的只有 8 种(Dean *et al*., 2001; Roth *et al*., 2003; Sturm *et al*., 2009; Liu *et al*., 2011; Xie *et al*., 2012; Dermauw *et al*., 2013; Broehan *et al*., 2013; You *et al*., 2013),它们参与节肢动物对药物以及内外源毒素抗性的功能和机制已逐渐受到广泛关注。一方面,ABC 转运蛋白可作为运输物质的载体,将有害物质排出体外。由于目前在节肢动物中对这方面的机制了解得还比较少,因此可以借鉴研究人类 ABC 转运蛋白转运药物产生抗药性的思路及方法来开展研究。另一方面,ABC 转运蛋白可以作为药物受体而引发一系列与抗药性相关的生理活动,是目前研究的热点。

在鳞翅目昆虫中,ABC 转运蛋白 ABCC2 基因的突变能够引起对 Bt 毒素的抗性(Gahan *et al*., 2010; Baxter *et al*., 2011; Atsumi *et al*., 2012)。但是,这种抗性是否在所有物种中都普遍存在,其抗性水平和机制以及影响抗性的因素等,目前尚不清楚。ABCC2 突变的同时减少了将其他毒素及次生代谢产物从细胞内的输出,这种适合度代价方面的影响是否也可以被用来在田间应对 Bt 抗性的机制?最近的研究表明 Bt 毒素的作用方式比我们预期的要复杂的多(Gahan *et al*., 2010),细胞对 Bt 毒素的作用方式是由一个信号通路来调节的,ABCC2 存在于这个信号通路中,但目前还不知道它在这个信号通路中所起的具体作用以及 ABCC2 基因的突变如何影响细胞对毒素的选择(Gahan *et al*., 2010)。鳞翅目昆虫对 Cry1A 毒素产生抗性的遗传基础是比较复杂的,至少有 4 个不同的基因参与,其中有 3 个主效基因在多个物种存在。因此,阐明 ABCC2 基因与它们之间的相互作用及机制仍然是一个具有挑战的课题(Heckel *et al*., 2007; Baxter *et al*., 2011)。

随着对 ABC 转运蛋白研究的不断深入,将为认知节肢动物如何应对环境改变或杀虫剂胁迫奠定重要的理论基础,我们也可能会发现 ABC 转运蛋白更多重要的生理功能,通过对它开展遗传调控,服务于农业害虫的有效防治和持续控制。

参考文献(References)

Ambudkar SV, Lelong IH, Zhang J, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I, 1992. Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 8472 – 8476.

Ames GF, Mimura CS, Shyamala V, 1990. Bacterial periplasmic

permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: traffic ATPases. *FEMS Microbiology Reviews*, 6: 429 - 446.

Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, Kadono-Okuda K, Wada S, Kanda K, Goldsmith MR, Noda H, 2012. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: E1591 - E1598.

Baxter SW, Badenes-Pérez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, Wang P, Heckel DG, Jiggins CD, 2011. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189: 675 - 679.

Bouige P, Laurent D, Piloyan L, Dassa E, 2002. Phylogenetic and functional classification of ATP-binding cassette (ABC) systems. *Current Protein and Peptide Science*, 3(5): 541 - 559.

Broehan G, Kroeger T, Lorenzen M, Merzendorfer H, 2013. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 14: 6.

Buss DS, Callaghan A, 2008. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90: 141 - 153.

Chahine S, O'Donnell MJ, 2009. Physiological and molecular characterization of methotrexate transport by Malpighian tubules of adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 55: 927 - 935.

Chahine S, O'Donnell MJ, 2011. Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 214: 462 - 468.

Chen HL, Liu YJ, Chen HL, Wu SH, Ni YH, Ho MC, Lai HS, Hsu WM, Hsu HY, Tseng HC, Jeng YM, Chang MH, 2008. Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia. *Pediatric Research*, 63: 667 - 673.

Dassa E, Bouige P, 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 152: 211 - 229.

Dean M, Annilo T, 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (Abc) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 6: 123 - 142.

Dean M, Hamon Y, Chimini G, 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42: 1007 - 1017.

Deeley RG, Westlake C, Cole SPC, 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological Reviews*, 86: 849 - 899.

Dermauw W, Osborne EJ, Clark RM, Grbic M, Tirry L, Van Leeuwen T, 2013. A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, 14: 317.

Ferré J, Van Rie J, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47: 501 - 533.

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44: 507 - 533.

Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857 - 860.

Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG, 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genetics*, 6: e1001248.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE, 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2: 48 - 58.

Gyimesi G, Ramachandran S, Kota P, Dokholyan NV, Sarkadi B, Hegedüs T, 2011. ATP hydrolysis at one of the two sites in ABC transporters initiates transport related conformational transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808: 2954 - 2964.

He WY, You MS, Vasseur L, Yang G, Xie M, Cui K, Bai JL, Liu CH, Li XJ, Xu XF, Huang SG, 2012. Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genomics*, 99: 169 - 177.

Heckel DG, 2012. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104: 103 - 110.

Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, Gould F, Tabashnik BE, 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 192 - 197.

Higgins CF, 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8: 67 - 113.

Higgins CF, Linton KJ, 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11: 918 - 926.

Holland IB, Cole SPC, Kuchler K, Higgins CF, 2003. ABC Proteins: from Bacteria to Man. Academic Press, London/San Diego.

Hollenstein K, Dawson RJP, Locher KP, 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 17: 412 - 418.

Jones PM, George AM, 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 682 - 699.

Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ, 2002. Altered glycosylation of 63-and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5711 - 5717.

Karnaky KJ, Hazen-Martin D, Miller DS, 2003. The xenobiotic transporter, MRP2, in epithelia from insects, sharks, and the human breast: implications for health and disease. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 300: 91 - 97.

Kerr ID, 2004. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315: 166 - 173.

Labbé R, Caveney S, Donly C, 2011a. Expression of multidrug resistance proteins is localized principally to the Malpighian tubules in larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Journal of Experimental Biology*, 214: 937 – 944.

Labbé R, Caveney S, Donly C, 2011b. Genetic analysis of the xenobiotic resistance-associated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 20: 243 – 256.

Lanning CL, Fine RL, Corcoran JJ, Ayad HM, Rose RL, Abou-Donia MB, 1996. Tobacco budworm P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1291: 155 – 162.

Lee MK, Rajamohan F, Gould F, Dean DH, 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3836 – 3842.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231 – 253.

Linton KJ, 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology*, 22: 122 – 130.

Liu SM, Zhou S, Tian L, Guo EE, Luan YX, Zhang JZ, Li S, 2011. Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 12: 491.

Lombardo L, Pellitteri R, Balazy M, Cardile V, 2008. Induction of nuclear receptors and drug resistance in the brain microvascular endothelial cells treated with antiepileptic drugs. *Current Neurovascular Research*, 5: 82 – 92.

Mackenzie SM, Brooker MR, Gill TR, Cox GB, Howells AJ, Ewart GD, 1999. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1419: 173 – 185.

Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 5004 – 5009.

Murray CL, Quaglia M, Arnason JT, Morris CE, 1994. A putative nicotine pump at the metabolic blood-brain barrier of the tobacco hornworm. *Journal of Neurobiology*, 25: 23 – 34.

Pigott CR, Ellar DJ, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 255 – 281.

Post LC, Vincent WR, 1973. A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften*, 60: 431 – 432.

Ranson H, Hemingway J, 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401: 226 – 241.

Roth CW, Holm I, Graille M, Dehoux P, Rzhetsky A, Wincker P, Weissenbach J, Brey PT, 2003. Identification of the *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter superfamily genes. *Molecules and Cells*, 15: 150 – 158.

Saurin W, Hofnung M, Dassa E, 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 22 – 41.

Seeger MA, van Veen HW, 2009. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 1794: 725 – 737.

Shapiro AB, Ling V, 1997. Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *European Journal of Biochemistry*, 250: 122 – 129.

Soberon M, Gill SS, Bravo A, 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66: 1337 – 1349.

Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318: 1640 – 1642.

Sturm A, Cunningham P, Dean M, 2009. The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10: 170.

Tanaka S, Miyamoto K, Noda H, Jurat-Fuentes JL, Yoshizawa Y, Endo H, Sato R, 2013. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS Journal*, 280: 1782 – 1794.

Theodoulou FL, Holdsworth M, Baker A, 2006. Peroxisomal ABC transporters. *FEBS Letters*, 580: 1139 – 1155.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ, 1982. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1: 945 – 951.

Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 563 – 572.

Wenzel JJ, Piehler A, Kaminski WE, 2006. ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho-and sphingolipid transport. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12: 3177 – 3193.

Xie XD, Cheng TC, Wang GH, Duan J, Niu WH, Xia QY, 2012. Genome-wide analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 39: 7281 – 7291.

Xu XJ, Yu LY, Wu YD, 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 948 – 954.

You MS, Yue Z, He WY, Yang XH, Yang G, Xie M, Zhan DL, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai JL, Wang P, Cui K, Huang SG, Li XC, Zhou Q, Wu ZY, Chen QL, Liu CH, Wang B, Li XJ, Xu XF, Lu CX, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen MS, Xia XF, Tang WQ, Ke FS, Zheng DD, Hu YL, Song FQ, You YC, Ma XL, Peng L, Zheng YK, Liang Y, Chen YQ, Yu LY, Zhang YN, Liu YY, Li GQ, Fang L, Li JX, Zhou X, Luo YD, Gou CY, Wang JY, Wang J, Yang HM, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature Genetics*, 45: 220 – 225.

（责任编辑：赵利辉）